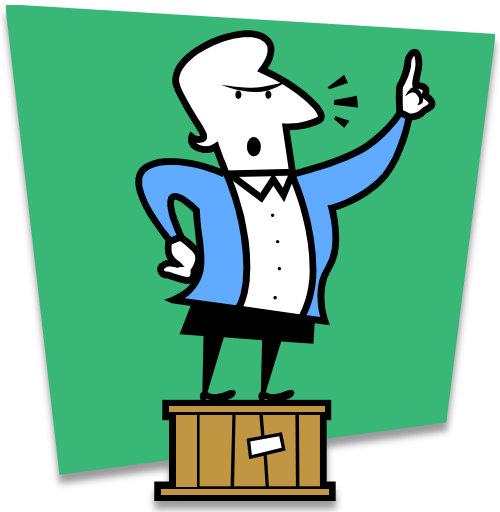
Thema der Vorlesung



Milchsäurebakterien

Vorkommen
Lebensmittelkonservierung
Hetero- und homofermentative Milchsäurebakterien
Bifidobakterium

Steckbrief Milchsäurebakterien

Gattungen: Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Bifidobacterium

Aber im weiteren Sinne auch:
Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus und Weisella

- säuretolerant bis pH 3,5
- Morphologie variabel (oft Kokken oder Stäbchen)
- Gram-positiv, i.a. keine Sporen
- meist unbeweglich
- obligate Gärer (keine Hämbiosynthese)
- zumeist aber aerotolerant
- sehr reduzierter Stoffwechsel (eher kleine Genome)

MSBs spalten mit Hilfe der ß-Galactosidase Milchzucker (Lactose) zu Glucose und Galactose

Sie gewinnen Ihre Energie durch Fermentation und Produktion von Lactat D-, oder L- oder auch beides

Schlüsselenzym ist die D- oder L-Lacatdehydrogenase

Vorkommen
- Pflanzen
- Milch und Milchprodukte
- Darm/Schleimhäute
- normale Hautflora verhindert Besiedelung durch pathogene Keime

Pathogenität
- relativ wenige pathogene Vertreter (*Streptococcus pyogenes, S. mutans*)

Probiotische Organismen
- MSB beugen Durchfallerkrankungen vor
- stimulieren das Immunsystem
- bauen Laktose rasch ab, bei Laktoseunverträglichkeit
- supprimieren ggf. pathogene Keime

Biotechnologie
Zentrale Rolle in der Lebensmittelherstellung und Konservierung

Milchsäure als Konservierungsmittel: Milchsäurebakterien in Nicht-Milchprodukten

Weißkohl + 2-3% NaCl
------- (Leuconostoc, Lactobacillus plantarum) ------
→ **Sauerkraut**

Sauerteig: Ansäuerung durch Milchsäurebakterien

Rohwurst (Salami, Cervelat):
Ansäuerung durch Milchsäurebakterien (Starterkulturen)
Konservierung durch Erniedrigung des pH-Wertes
z.T. Penicillium als weißer Schimmelbelag

Milchsäurebakterien in Milchprodukten

Milch + Starterkulturen (Säurewecker) →
Säure (Konservierung)- und Geschmacksstoffbildung

Vollmilch: --- (Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, 2-3h, 45°C) → Joghurt
--- (Milchsäurebakterien) --- Sauermilch --- (Lactobacillus, Streptococcus) → Bioghurt
--- (Milchsäuebakterien und Hefen) → Kefir

Rahm: --- (Lactococcus, Leuconostoc) → Sauerrahmbutter (Säure und Diacetyl)
→ Buttermilch

Milchsäurebakterien in Milchprodukten

Milch + Starterkulturen (Säurewecker) → Säure (Konservierung)- und Geschmacksstoffbildung

Quark, Sauermilchkäse:
Koagulation des Caseins durch Milchsäurebakterien
mesophile Säuerungskulturen: Lactococcus (20 – 30°C)
Thermophile Säuerungskulturen: Streptococcus, Lactobacillus (32 – 45°C)

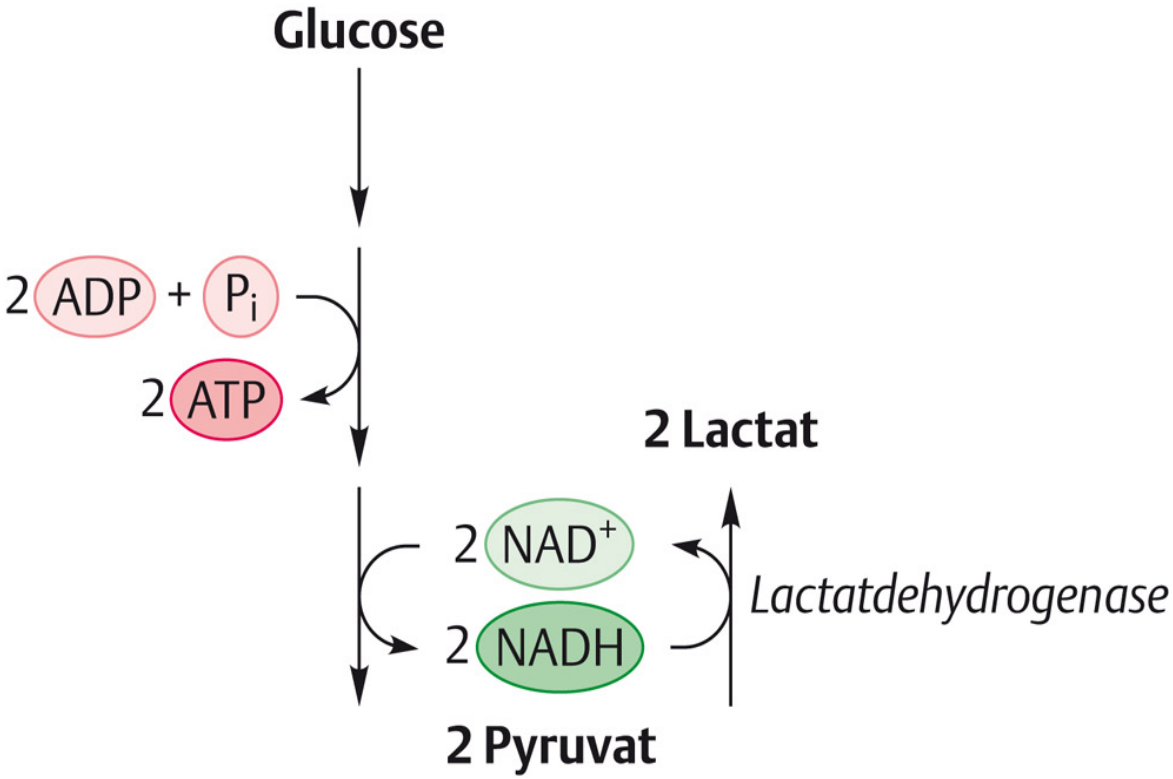
Schnitt- und Hartkäse:
Koagulation des Caseins durch Labferment
(proteolytisches Enzym)
parallel: Ansäuerung durch Milchsäurebakterien

zus. weitere Mikroorganismen:
Probionibakterien → Emmentaler
Schimmelpilze → Camembert, Roquefort

Chymosin: enzmatisches Labferment, Lactoferm etc..

Milchprodukte

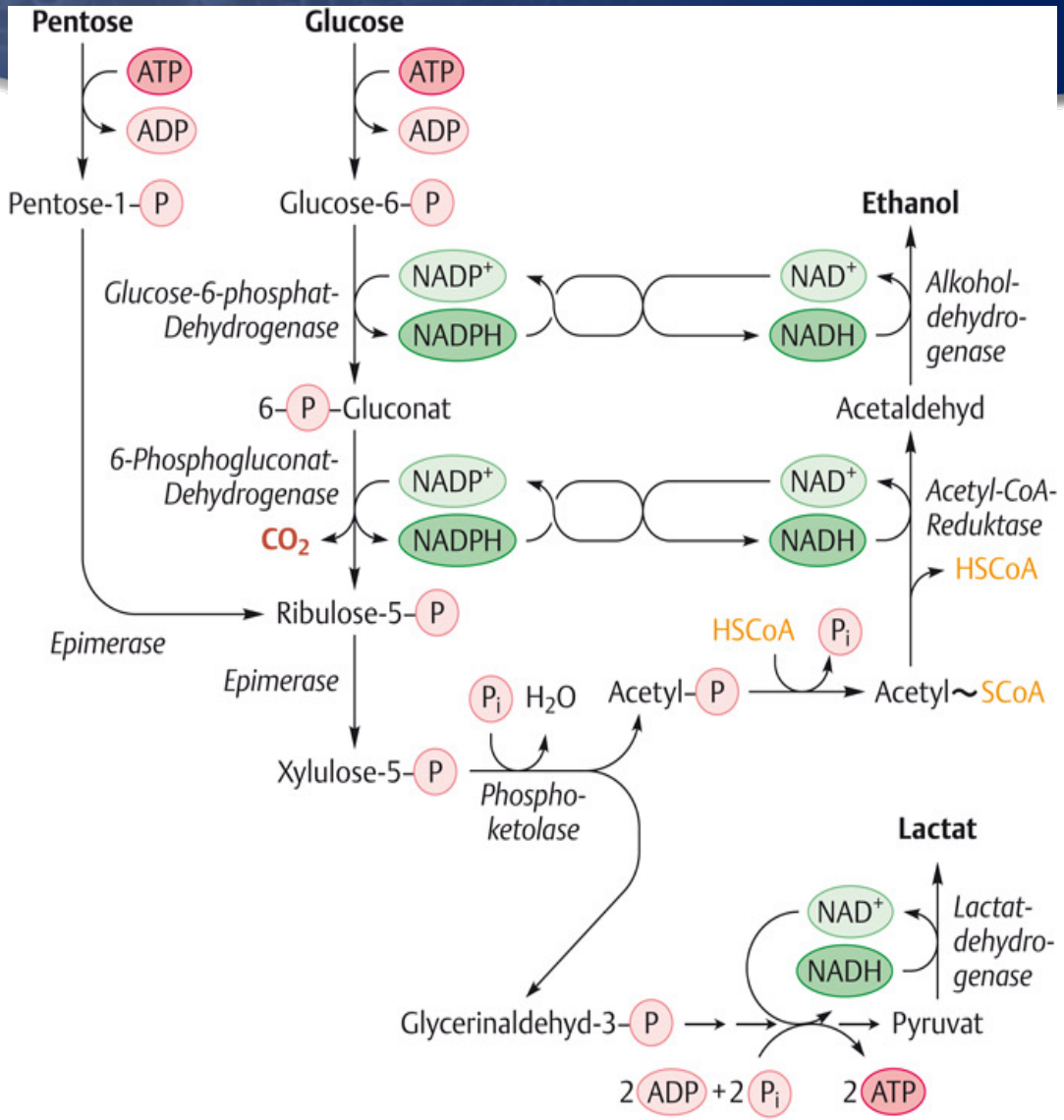
Cheddar, Cottage:	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* und *cremoris*	
Blue:	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* und *cremoris* (plus *Penicillum roqueforti*)	
Mozzarella:	*Streptococcus thermophilus* *L. Delbreckii* subsp. *bulgaricus* *L. helveticus*	
Swiss:	*Streptococcus thermophilus* *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *L. helveticus*	und später *Propionbacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*
Joghurt:	*Streptococcus thermophilus* *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	
Buttermilch:	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* *Lactococcus lactis* subsp. Lactis	plus *Leuconostoc* sp. Cit+ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Sour cream:	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* *Lactococcus lactis* subsp. Lactis	



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Homofermentative
Milchsäuregärung

Energie:
2 Mol ATP/Mol Glucose

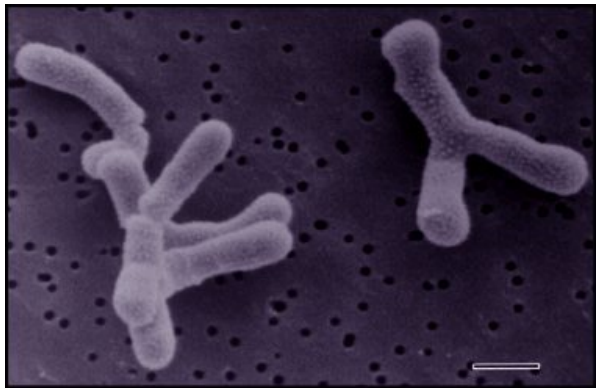


Heterofermentative **Milchsäuregärung**

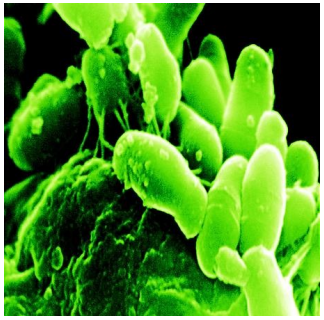
Energie:
1 ATP/ Mol
Glucose aber 2 ATP
pro Mol einer
Pentose

Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Bifidobacterium (bifidus = gespalten, V-Form)



- Gram-positiv
- anaerob
- verzweigt
- stäbchenförmig
- kommt im Darm von Kleinkindern vor, bei Erwachsenen kaum.
- macht ca. 90% der Darmflora bei Säuglingen aus
- Bifidobacterium kommt in der Muttermilch vor, es benötigt N-Glucosamin aus Muttermilch



- eigener Stoffwechselweg
- Genomgröße ca. 1,6 Mb
- probiotische Wirkung
- sehr starke Phosphoketolaseaktivität
- nicht aerotolerant

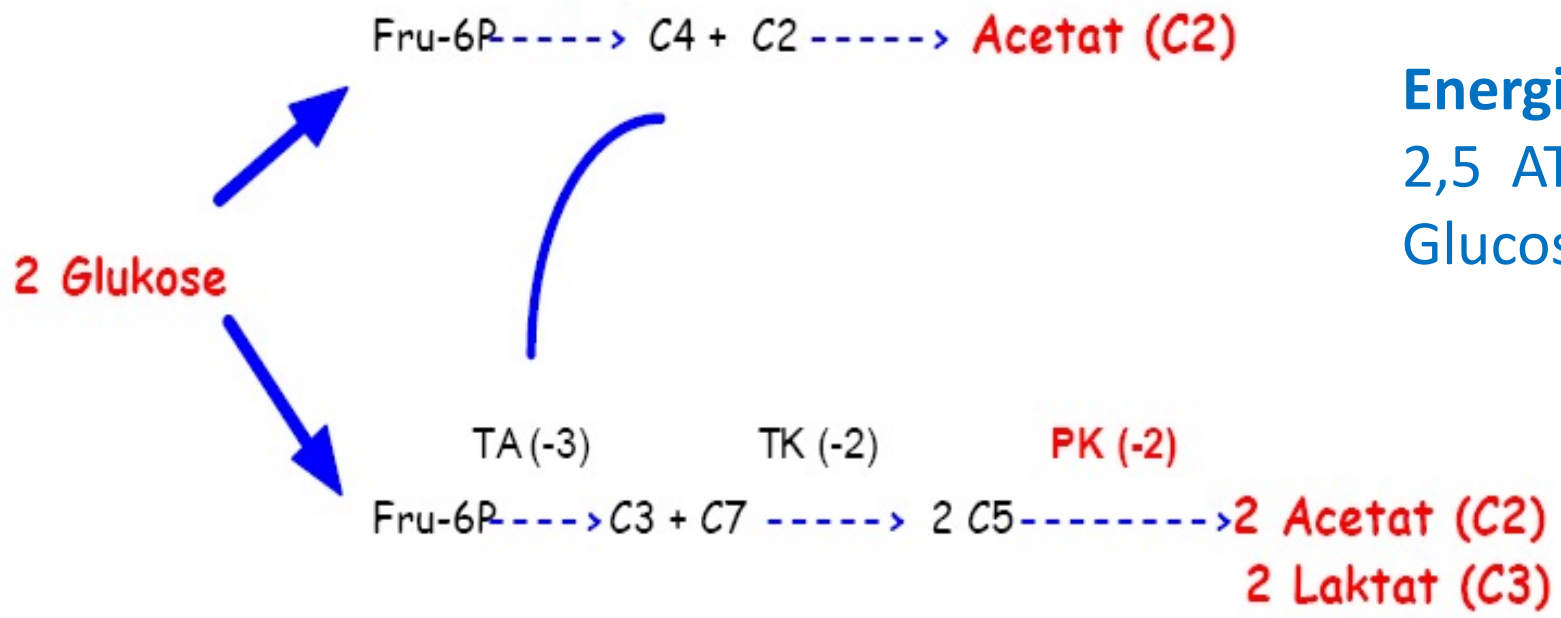
es gibt ca. 15 unterschiedliche Gattungen,
taxonomisch zu:
Actinobacteria (Klasse)
Bifidobacteriales
Bifidobacteriaceae

typ. Organismen
B. bifidum, B. adolescentis,
B. breve, B. longum, B. infantis

Bifidobakterium eigener Stoffwechselweg:

2 Glucose zu 2 Lactat und 3 Acetat
(Phosphoketolase Nebenweg)

Bifidobakterium besitzt keine Aldolase, daher ist dieser Weg erforderlich



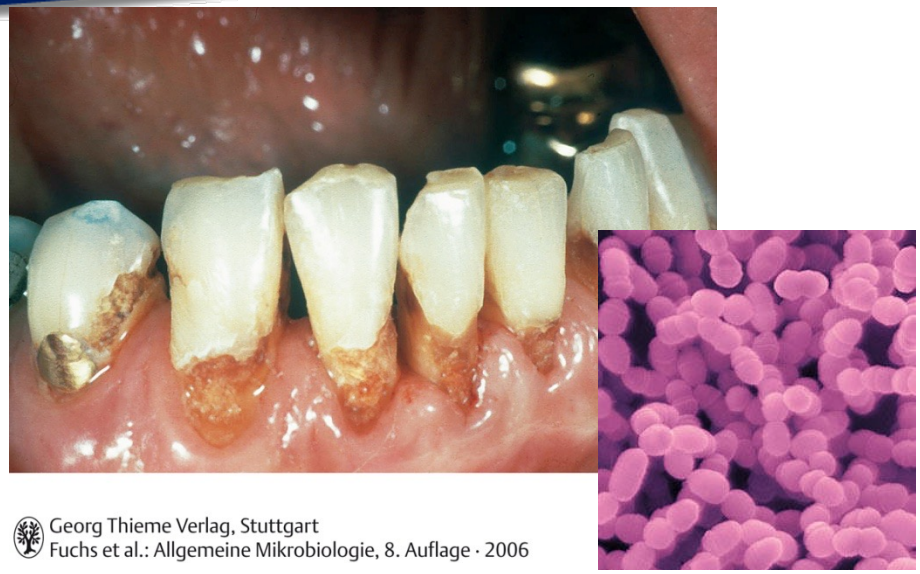
Energie:
2,5 ATP/Mol Glucose

Streptococcus mutans

&

S. salivarius

Karies!



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Streptococcus pyogenes: Scharlach!

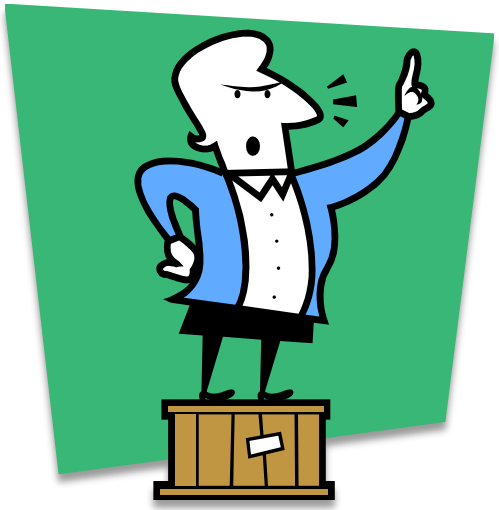
gehört zu den „A-Streptokokken“
Fieber, Halsschmerzen, Bläschen an Händen und Füßen,
erdbeerfarbene Zunge
hochansteckend
In einigen Bundesländern meldepflichtig

Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8

Thema der Vorlesung

Anaerobe Prozesse

Überblick Gärungen
Alkoholische Gärung
Buttersäuregärung
Milchsäuregärung
Gemischte Säuregärung
Butandiol-Fermenation

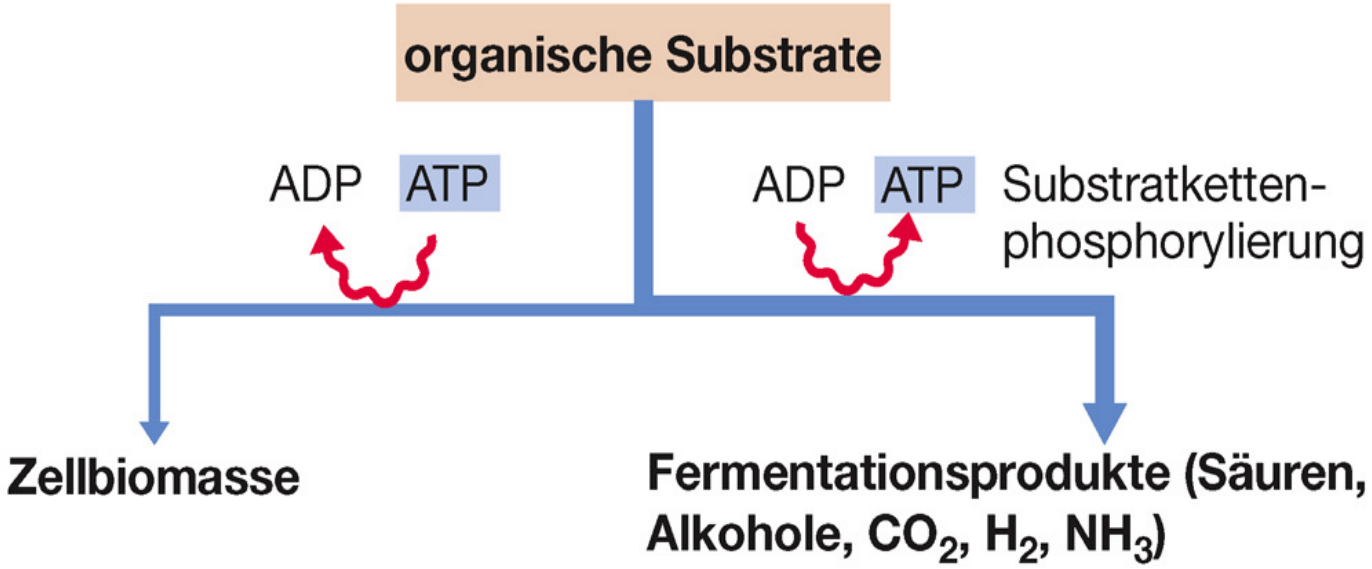


GÄRUNGEN : Leben ohne Sauerstoff

Abbau von Biopolymeren

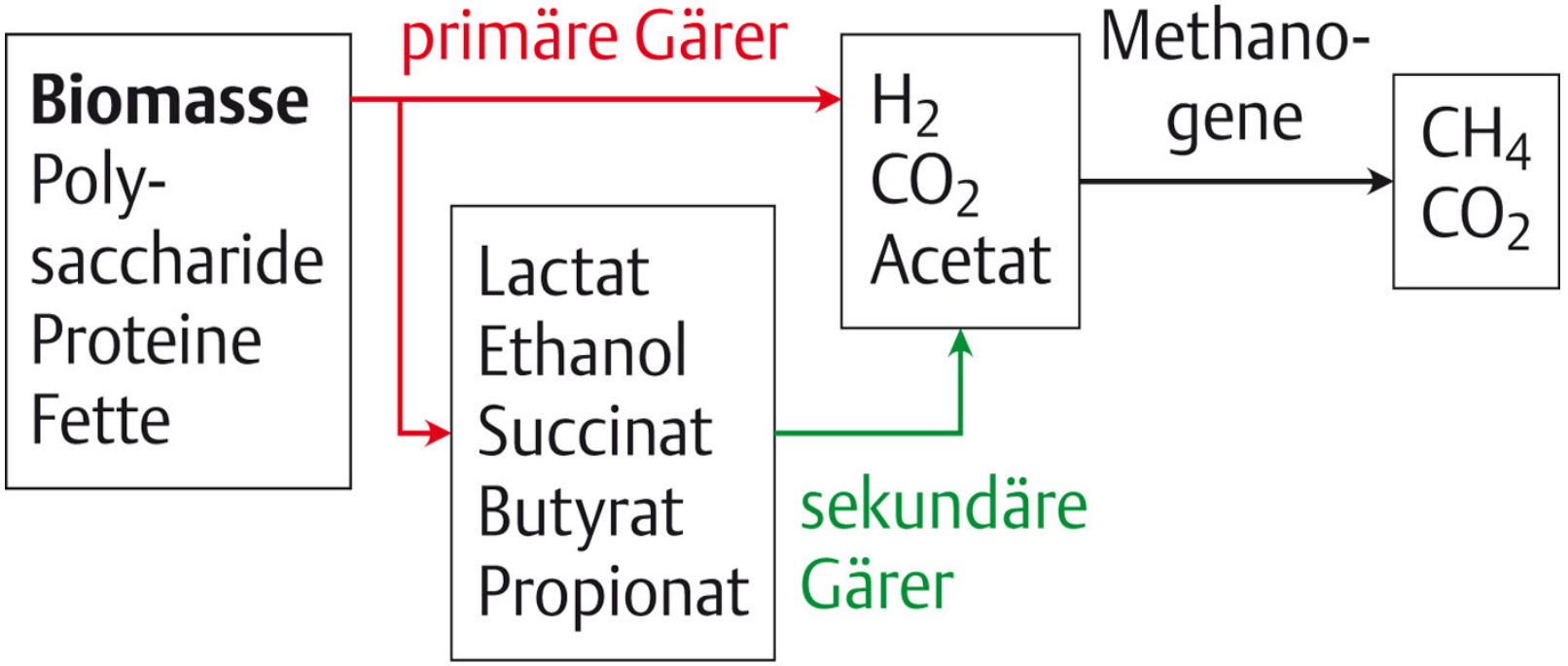
Wo:
in Seen, Sedimenten
Teichen, Faulschlammbehältern,
Intestinaltrakten,
Tiefseehabitaten,
Humus

Wo noch:
Lebensmittelbiotechnologie:
Bier, Wein, Silage etc...

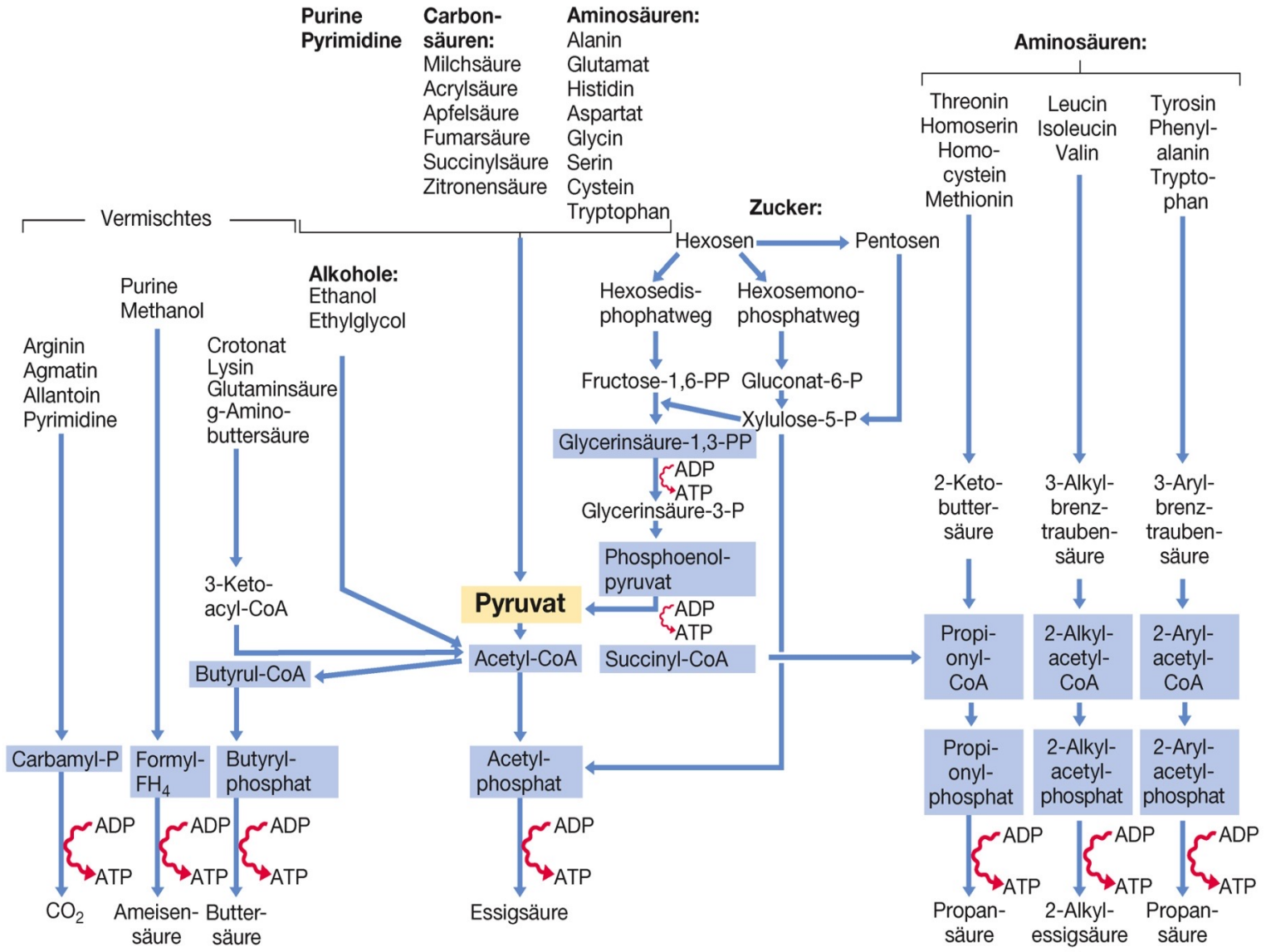


Gesamtverlauf einer Gärung

bei einer typischen Gärung wird ein Großteil des Kohlenstoffs in Form teilweise reduzierter Endprodukte des Energiestoffwechsels ausgeschieden und nur ein kleiner Teil für biosynthetische Reaktionen ausgenutzt



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

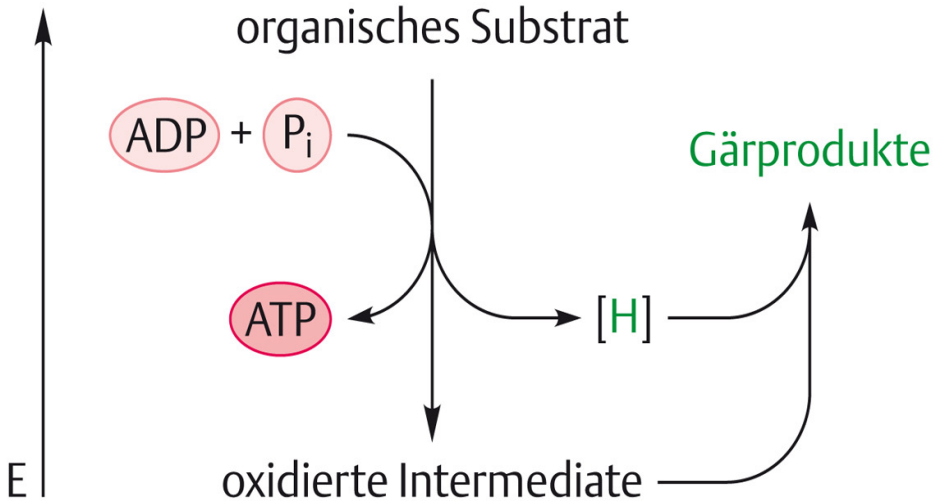

Purine
Pyrimidine
Carbon-säuren:
Milchsäure
Acrylsäure
Apfelsäure
Fumarsäure
Succinylsäure
Zitronensäure
Aminosäuren:
Alanin
Glutamat
Histidin
Aspartat
Glycin
Serin
Cystein
Tryptophan
Aminosäuren:
Threonin
Homoserin
Homo-cystein
Methionin
Leucin
Isoleucin
Valin
Tyrosin
Phenyl-alanin
Trypto-phan
Vermischtes
Zucker:
Hexosen
Pentosen
Purine
Methanol
Alkohole:
Ethanol
Ethylglycol
Arginin
Agmatin
Allantoin
Pyrimidine
Crotonat
Lysin
Glutaminsäure
g-Amino-buttersäure
Hexosedis-phophatweg
Hexosemono-phosphatweg
Fructose-1,6-PP
Gluconat-6-P
Xylulose-5-P
Glycerinsäure-1,3-PP
ADP
ATP
Glycerinsäure-3-P
Phosphoenol-pyruvat
3-Keto-acyl-CoA
Pyruvat
ADP
ATP
Acetyl-CoA
Succinyl-CoA
Butyrul-CoA
2-Keto-butter-säure
3-Alkyl-brenz-trauben-säure
3-Aryl-brenz-trauben-säure
Propi-onyl-CoA
2-Alkyl-acetyl-CoA
2-Aryl-acetyl-CoA
Carbamyl-P
Formyl-FH_4
Butyryl-phosphat
Acetyl-phosphat
Propi-onyl-phosphat
2-Alkyl-acetyl-phosphat
2-Aryl-acetyl-phosphat
CO_2
Ameisen-säure
Butter-säure
Essigsäure
Propan-säure
2-Alkyl-essigsäure
Propan-säure

Saccharomyces cerevisiae

Bei der Herstellung verschiedener Produkte spielt die Hefefermentation von *Saccaromyces cerevisiae* eine entscheidende Rolle

Gärungen als anaerober Stoffwechselweg

Problem:
Ohne Sauerstoff muss auch Energie gewonnen und die Redoxbalance gehalten werden!

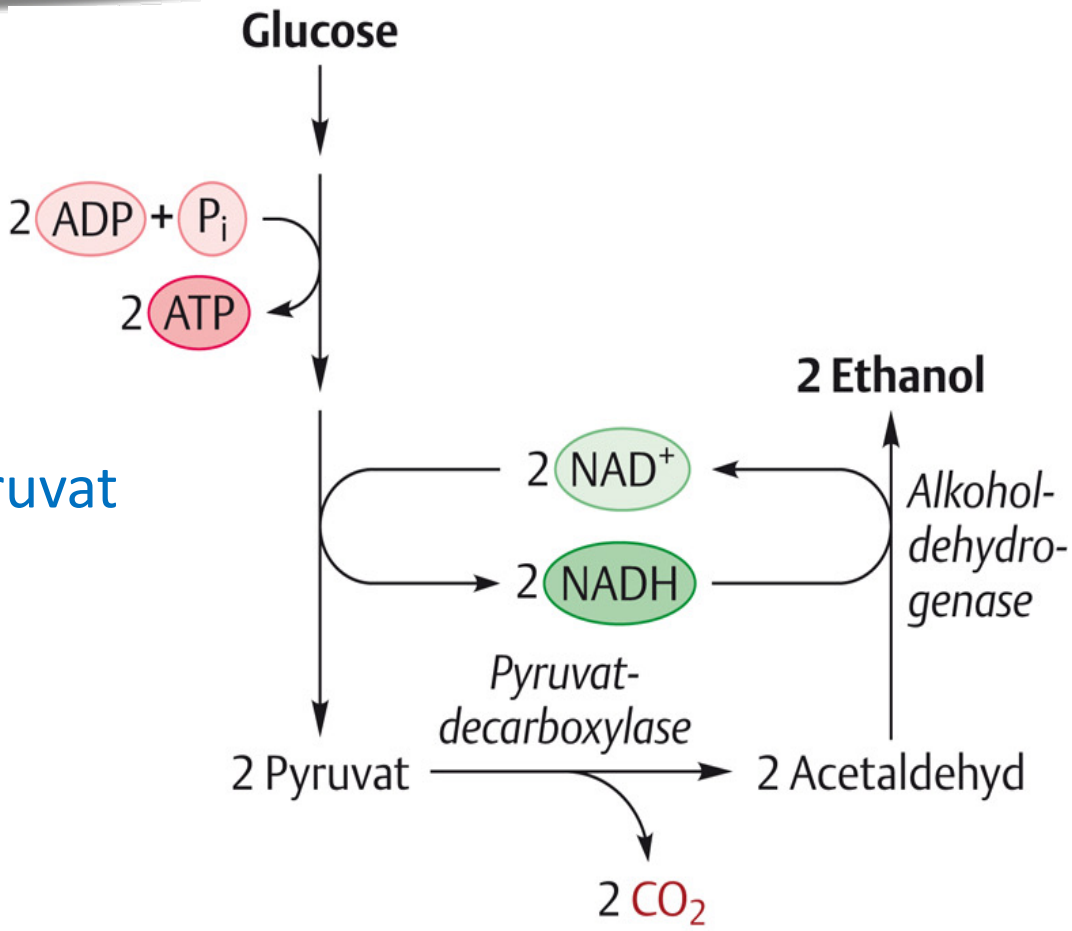


Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

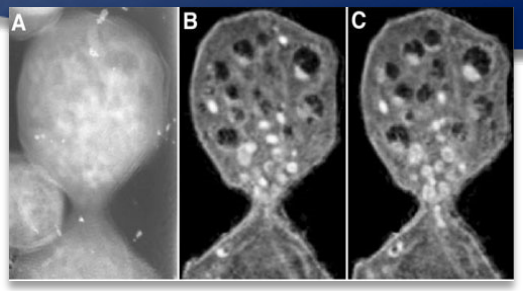
Hefen

- Glucose via Glycolyse zu Pyruvat
- dann Decarboxylierung und
- Alkoholdehydrogenase

Energie:
Netto 3-4 ATP max



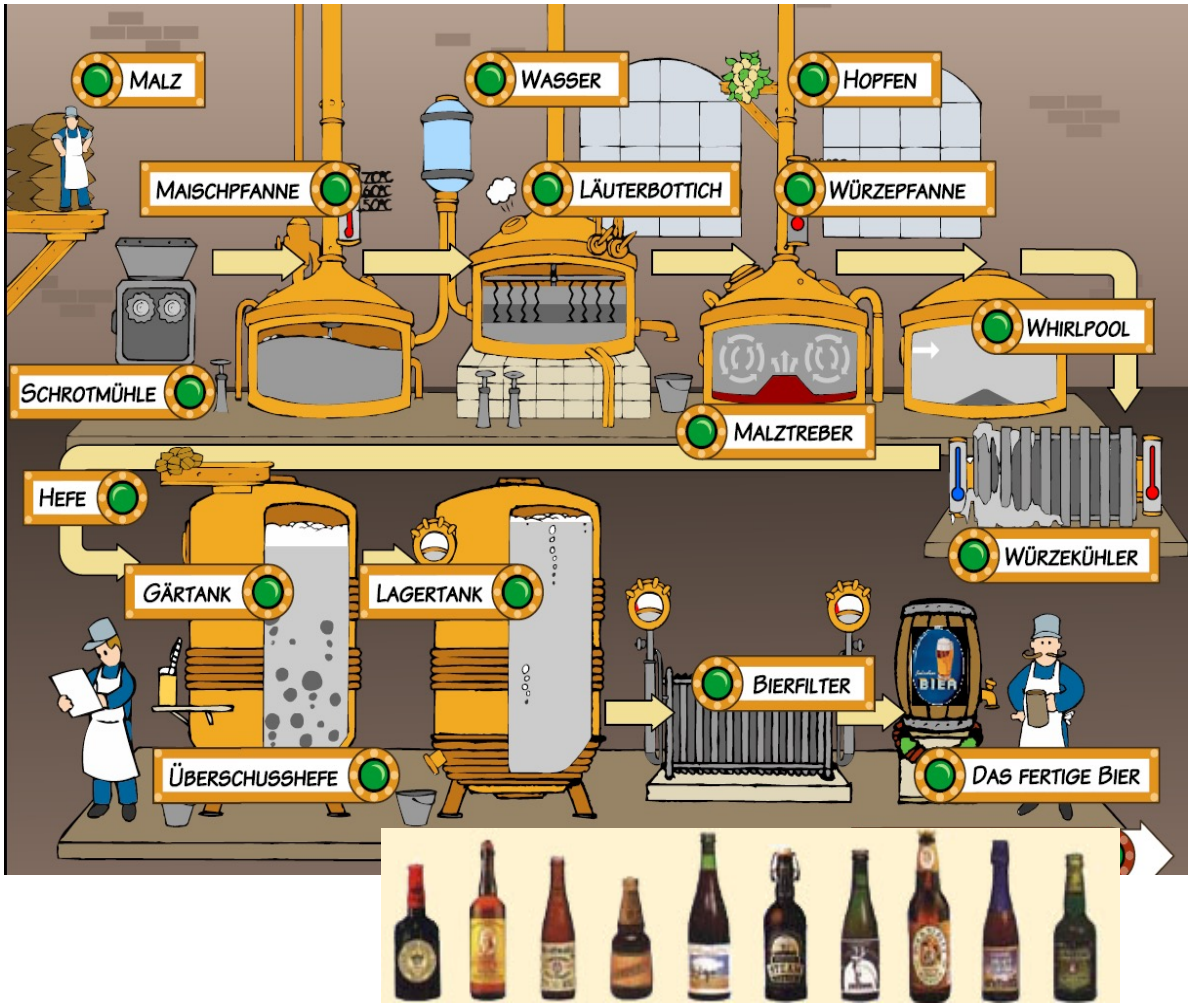
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006



Saccharomyces cerevisiae

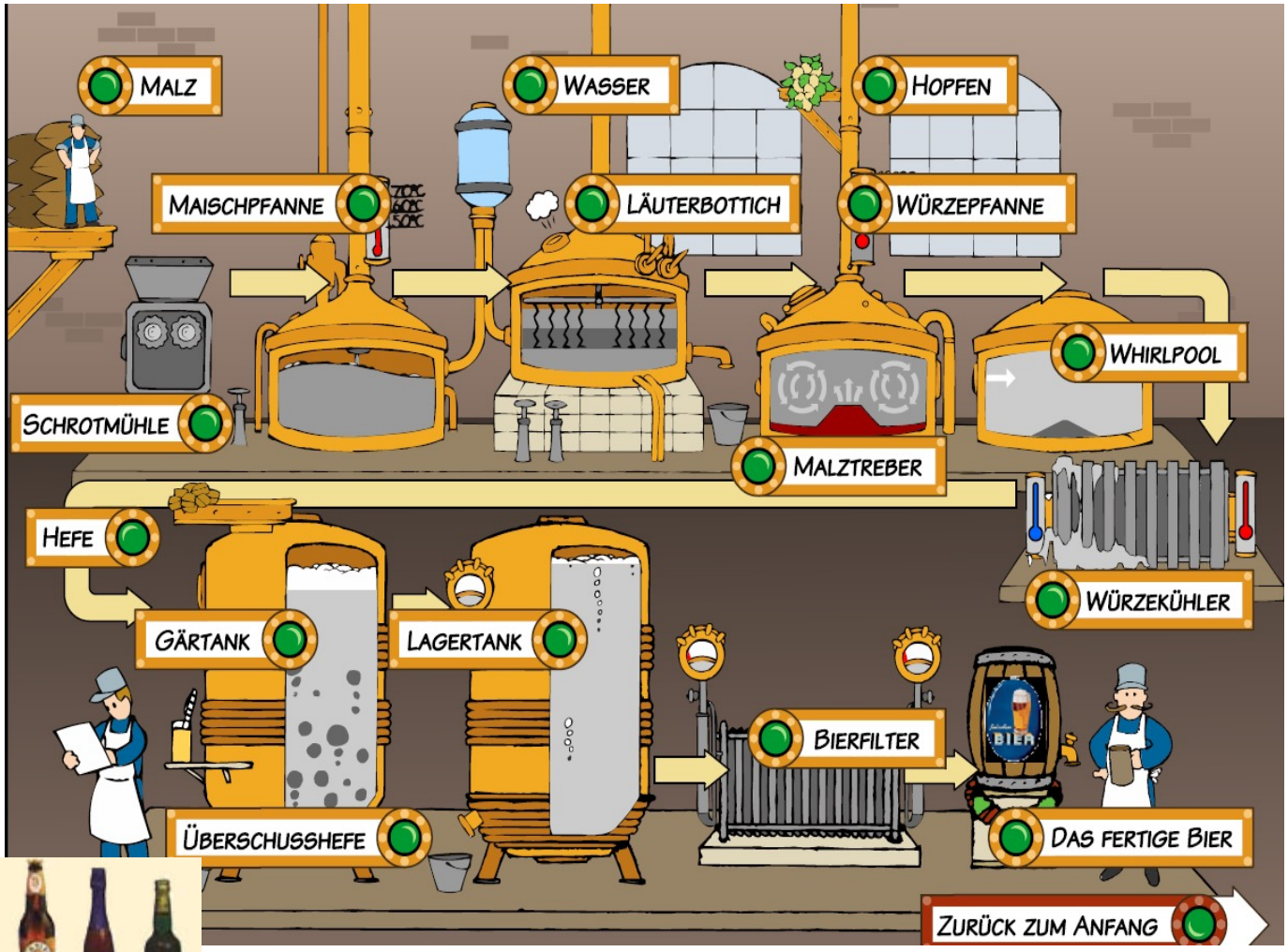
1 **L-Maß Bier**:

10 Mrd.	Hefezellen
1,3 L	Brauwasser
180 g	Gerste
1,8 g	Hopfen



Bierherstellung

- ✓ Mälzen
- ✓ Schroten
- ✓ Maischen
- ✓ Läutern
- ✓ Würzekochen
- ✓ Hopfengabe
- ✓ Klärung
- ✓ Kühlen
- ✓ Gärung
- ✓ Reifung
- ✓ Filtrieren
- ✓ Abfüllen



Weinherstellung

1. Pressen der Trauben/Keltern
2. Schwefeln (optionale Behandlung zumeist bei Weißwein; Entfernung des Restsauerstoffes und Reduktion der Essigsäurebakterien und nativer Hefen)
2. Trennung von Saft/Most/Maische und Rest (Schalen, Stiele, Kerne, Treber/Trester)
3. Klärung (enzymatisch oder natürlich)
4. Zusatz von Hefen oder natürliche Hefen belassen und Gärung:
   Hauptgärung einige Tage bis ca. 2-4 Wochen
   Je nach Hefeart (ober- oder untergärig) bei unterschiedlichen Temperaturen:
   untergärig: 12-14°C, meist weiss / obergärig 20-29°C, rot
5. Nachgärung Malo-Lacto-Fermenation:
   Milchsäurebakterien wandeln Äpfelsäure in Lactat um
6. Reifung im Holzfass (Eiche!) wenige Jahre (ca. 1-2)
   oder im Fermenter mit Holzstücken
7. Filtration, Abfüllung und Lagerung in Flaschen bis zu 200 Jahre!

Bei Rotwein wird die Maische und nicht der Saft vergoren weil in der Maische mehr Tannine, Flavonoide etc. enthalten sind

Tequila (Agavenschnaps)
Zymomonas mobilis

Bakterielle Ethanol-Produktion
Pyruvat-Decarboxylase: selten bei Bakterien, daher ist Ethanol selten das Hauptprodukt

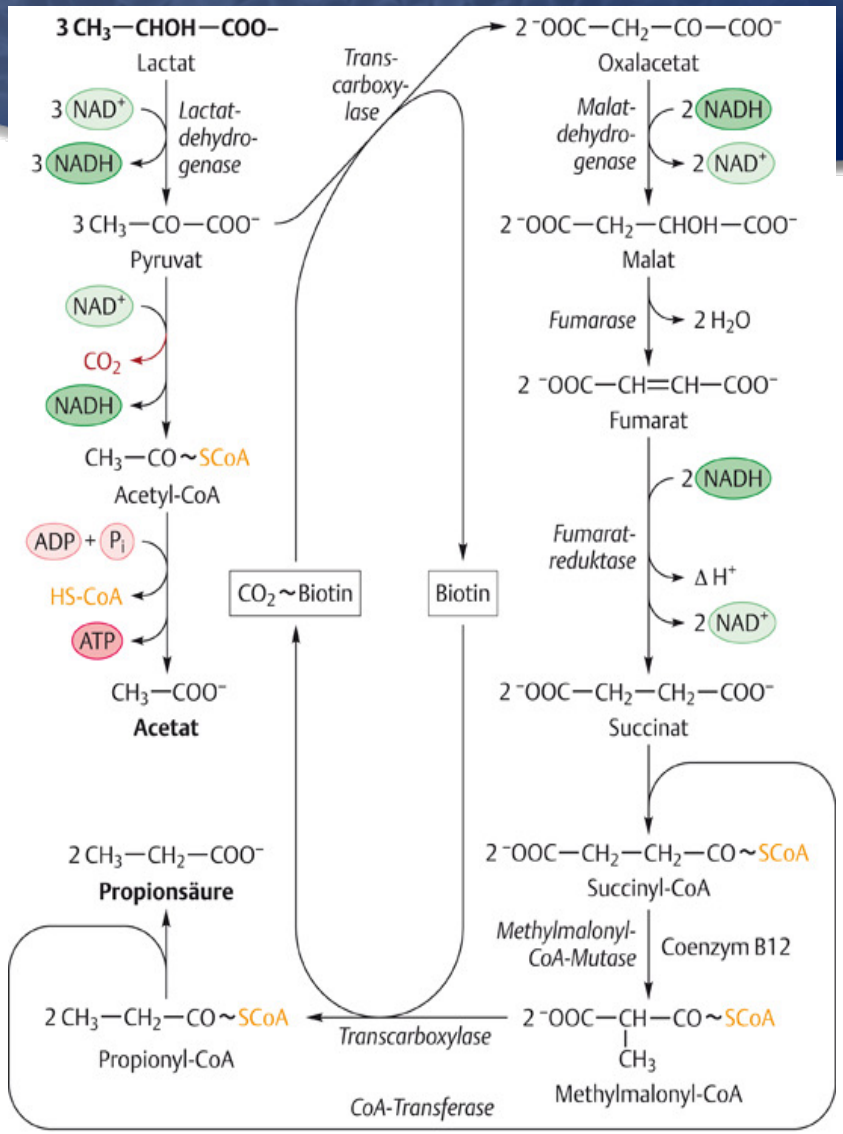
KDPG-Weg (**Hefe**: **FBP-Weg**)

Energie:
1 ATP/Glucose

EtOH als Nebenprodukt häufig bei Bakterien ohne Pyruvat-Decarboxylase, z.B.:

heterofermentative Milchsäuregärung (Leuconostoc):
Pentose-P-Weg

http://jb.asm.org/content/169/3/1024.full.pdf



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

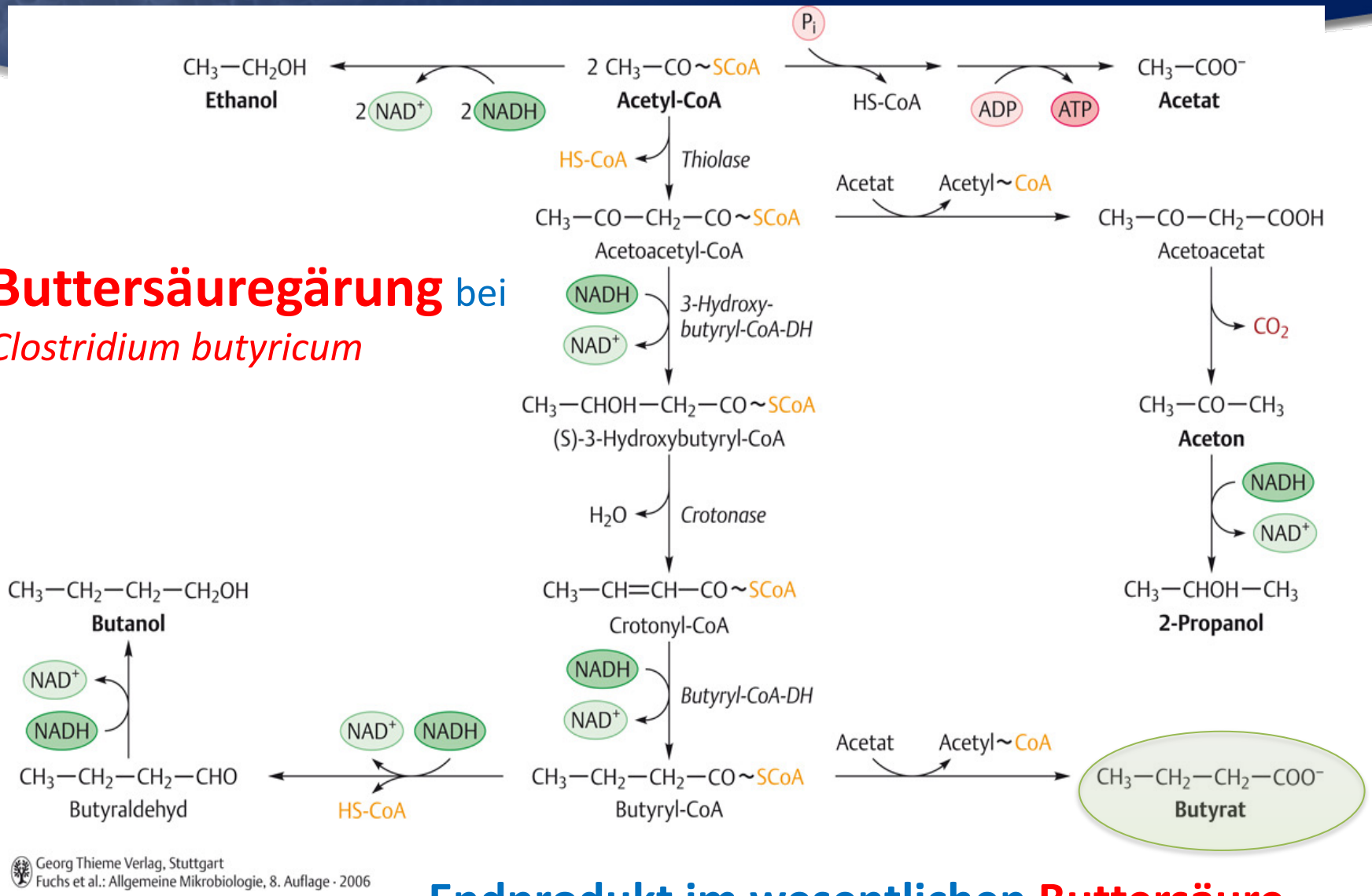
Propionsäuregärung

Methylmalonyl-CoA-Weg:
Citratzyklus rückwärts
Fumaratatmung und
2 Enzyme zusätzlich

Energie:
1 Mol ATP/ Mol Lactat

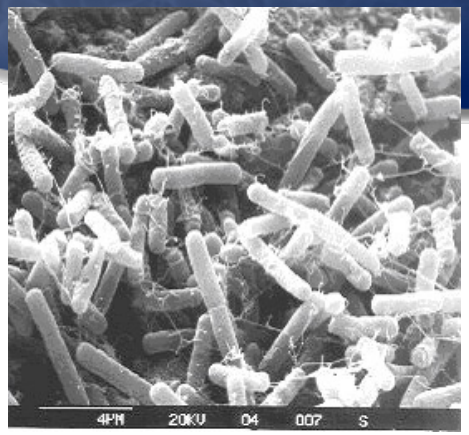
z.B. *Propionibacterium freundenreichii*
Aber auch Clostridien, Selenomonas,
Veillonella etc.

Buttersäuregärung bei
Clostridium butyricum

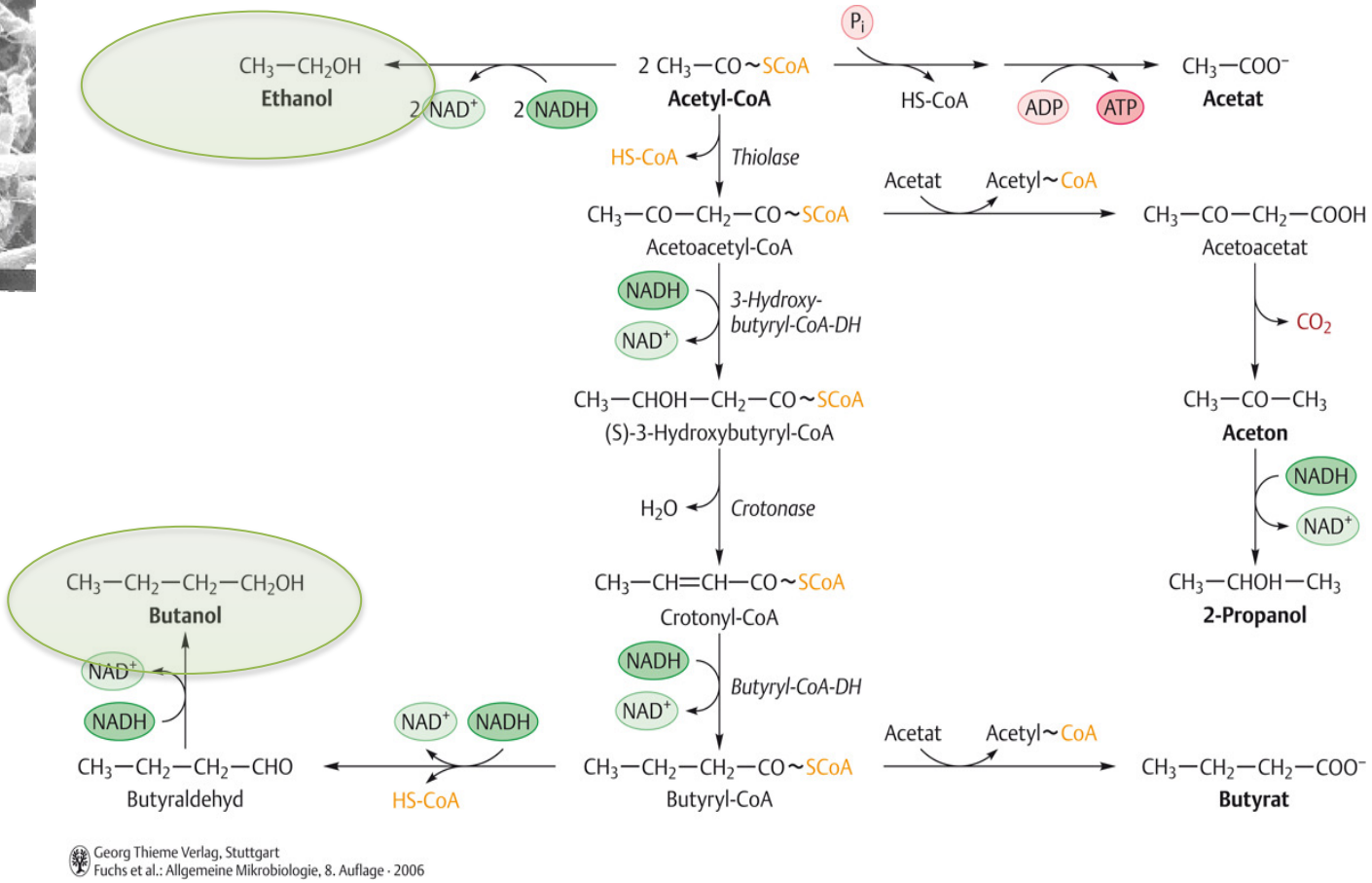


Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Endprodukt im wesentlichen Buttersäure



Chaim Weizmann



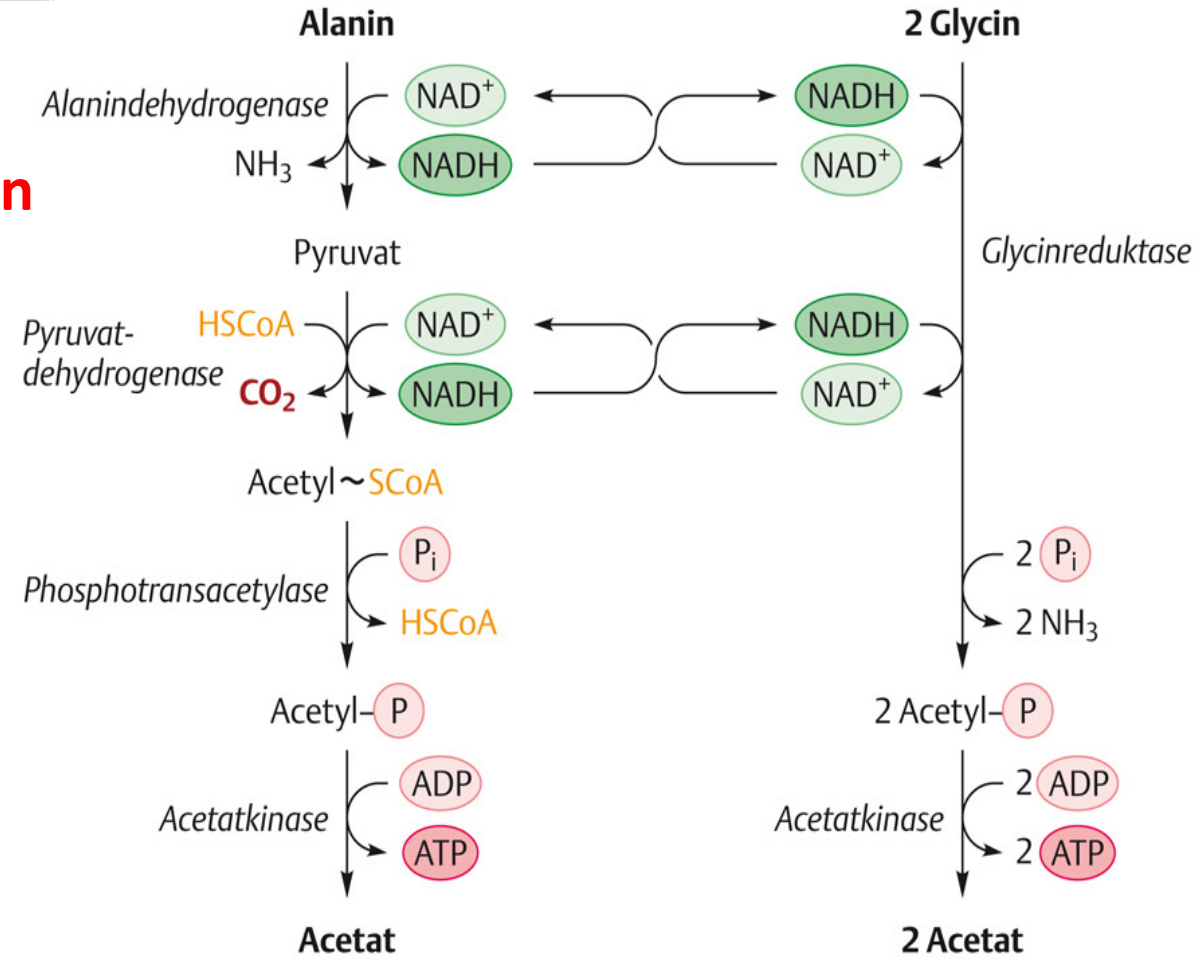
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Clostridium acetobutylicum produziert Acteon, Ethanol und Butanol aus Glucose

Aminosäurefermentation

bei den Clostridien
(Sticklandreaktion)

z.B. *Clostridium sticklandii*



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

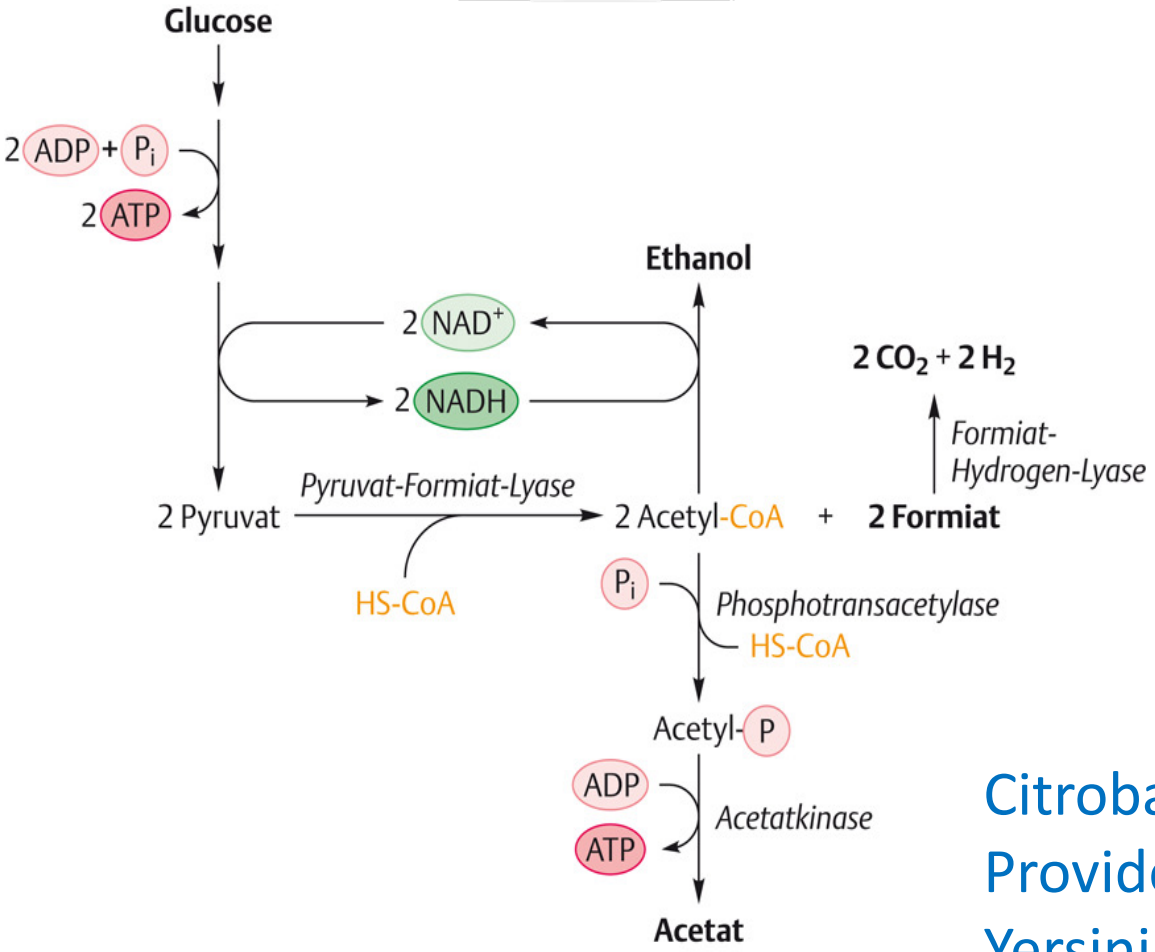
Steckbrief Enterobacteria

es gibt ca. 30 Gattungen mit vielen nicht-pathogenen aber auch etlichen pathogenen Vertretern
viele Enterobakterien sind als harmlose Mikroorganismen in unserem Verdauungstrakt vorhanden

- Genome z.B. 4,6Mb bei K12; 4288 Proteine
- Gram-negativ
- Stäbchen
- beweglich
- peritrich begeißelt
- fakultativ anaerob
- Cytochrome und Katalaseaktivität vorhanden
- auch Gärungen: gemischte Säuregärung und 2,3-Butandiol-Gärung

Typische Gattungen:

Escherichia, Erwinia, Salmonella, Shigella, Yersinia, Photobakterium, Proteus, Klebsiella



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Fermentationen von Enterobakterien

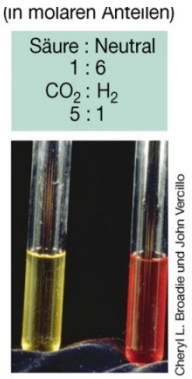
Unterscheidung zwischen der gemischten Säure- und der Butandiolgärung

Citrobacter, Escherichia, Proteus, Providencia, Salmonella, Shigella, Yersinia

Fermentationen von Enterobakterien

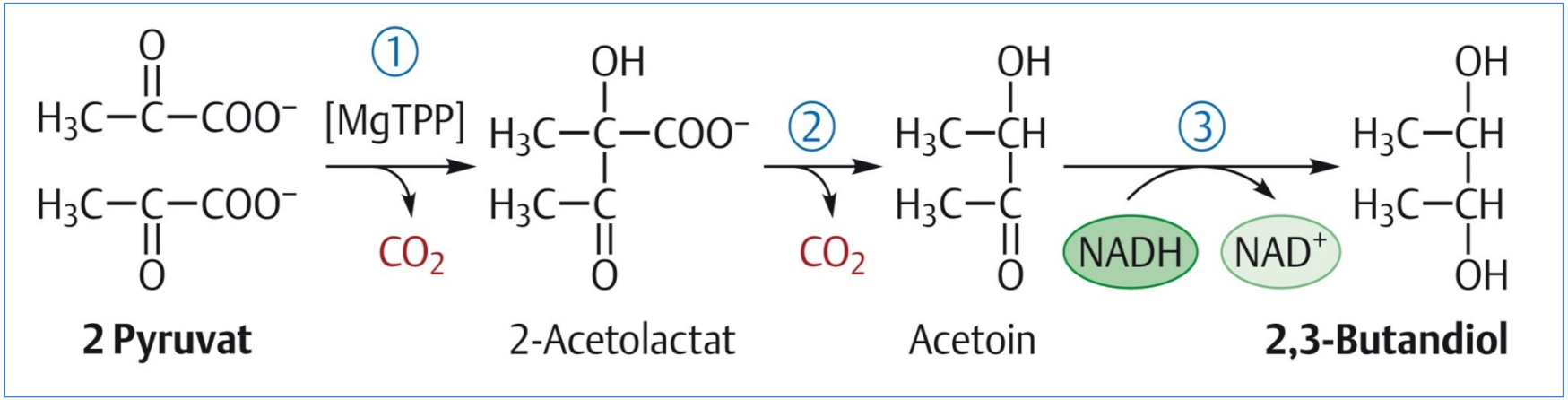
Unterscheidung zwischen der gemischten Säure- und der Butandiolgärung

Nachweis des Acetoins via Voges-Proskauer Reaktion

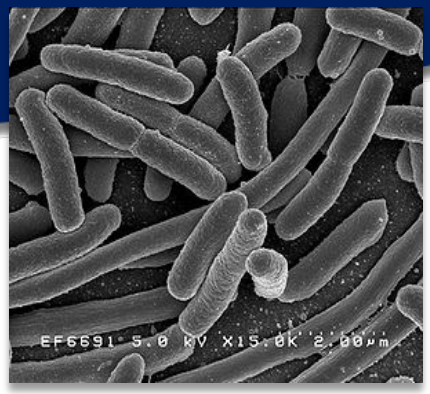


- Enterobacter
- Erwinia
- Klebsiella
- Serratia

①Acetolactatsynthase; ②Acetolatctat-Decarboxylase; ③Butandiol Dehydrogenase



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006



E. coli: Ein Name aber viele Gesichter

- In der Regel ein normaler Bewohner des Verdauungstraktes
- Verantwortlich für Vitaminbiosynthesen etc.

Einige Typen sind gefährlich!

- ETEC (Enterotoxisch)
- EPEC (Enteropathogen)
- EIEC (Enteroinvasiv)
- EHEC (Enterohaemorrhagisch)
z.B. 0157

EHEC Ausbreitung im Sommer 2011 in Hamburg

Bundesinstitut für Risikobewertung bestätigt

Bockshornklee-Samen aus Ägypten lösten Ehec aus

Dienstag, 29.11.2011, 19:21

Eine Laborantin vergleicht im Robert Koch Institut in Wernigerode multiresistente EHEC-Keime dpa

Bockshornkleesamen sind als Ursache des diesjährigen Ehec-Epidemie bestätigt worden. Das zuständige Institut fordert strenge hygienische Maßnahmen im Umgang mit den Samen. Verbraucher sollten weiter vorsichtig sein.

Empfehlen 22 17 1

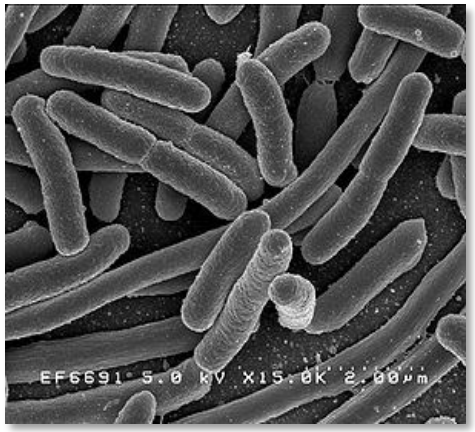
Wo und wie die Samen, die in einem niedersächsischen Gartenbaubetrieb und von Privatpersonen zur Sprossenproduktion verwendet wurden, mit dem Ausbruchserreger in Kontakt

30.11.2011

Ermittlungen wegen sechs toter Frühchen in Bremen

Der tödliche Infektionskeim auf einer Bremer Frühchenstation hat möglicherweise mehr Kinder das Leben gekostet als bisher bekannt. Die Staatsanwaltschaft ermittelt inzwischen wegen sechs toter Babys. Bislang war von drei Todesfällen im Klinikum Mitte die Rede. ZUM ARTIKEL

E. coli: Ein Name aber viele Gesichter

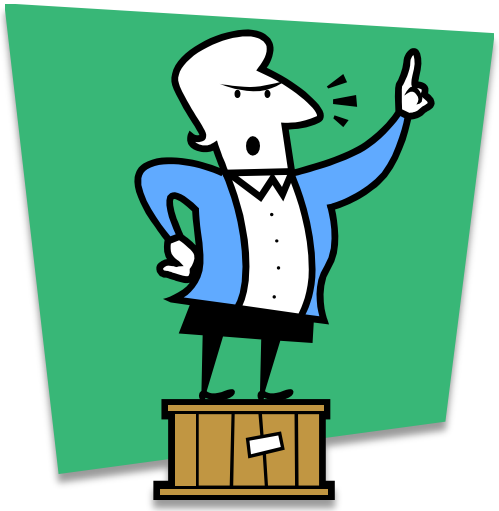


- häufiger Versursacher von
  - **Harnwegsinfekten**
  - **neonataler Meningits**
  - **Gastroenteritis**
  - **Wundinfektionen**
  - **etc.**

- **LPS (Endotoxin)** wird freigesetzt, wenn die Zellen absterben; das kann bei Antibiotika-Behandlung fatal sein

- einige Stämme haben zusätzliche Plasmide oder P-Inseln mit zusätzlichen Pathogenitätsfaktoren

Differenzierung der Enterobacteria



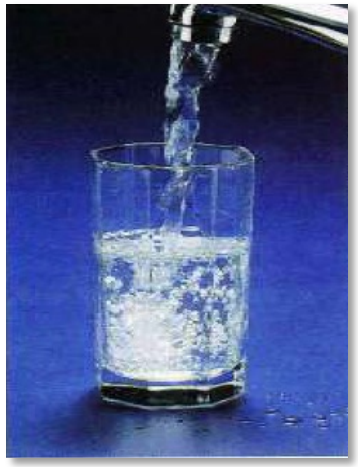
bunte Reihe

Beispiele für Typisierung

Trinkwasseranalyse

< 100 *E.coli*/ml

E.Coli meist harmlos,
aberIndikator für Fäkalien

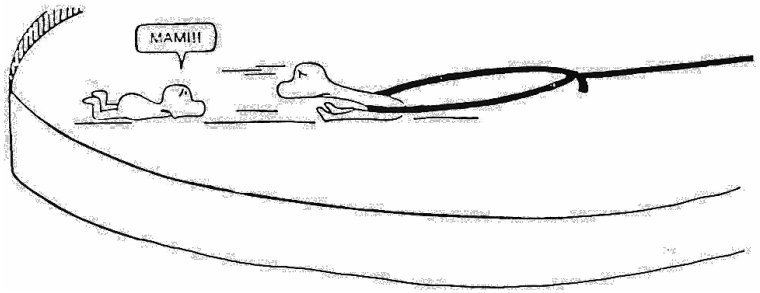


Vortest

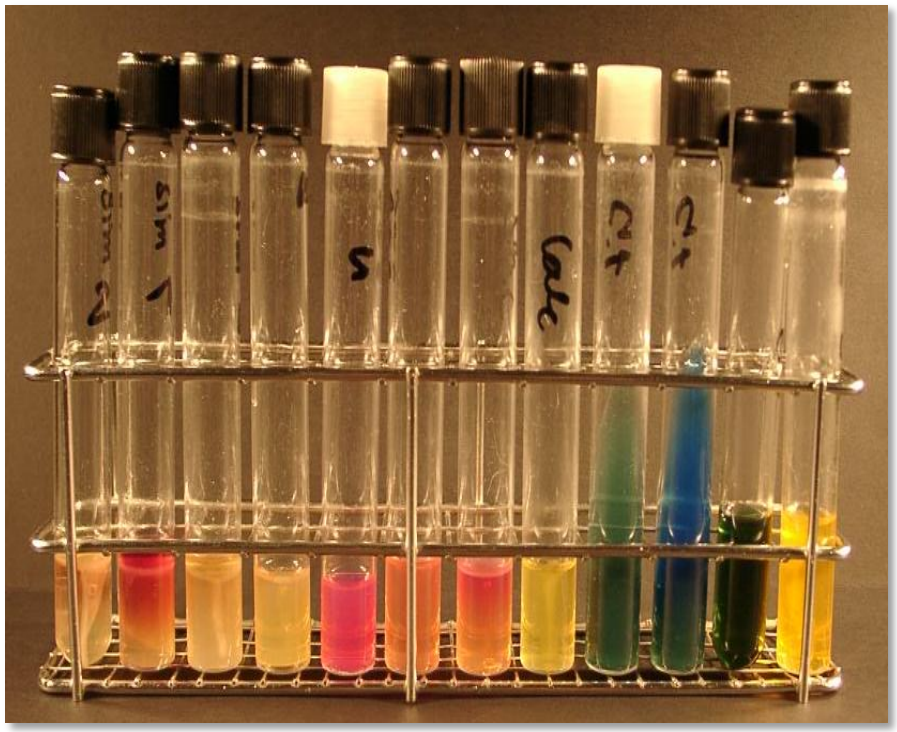
(1)Lactose-Pepton-Medium:

Lactose: β-Galaktosidase nötig (haben viele Bodenbakterien nicht)
→ Milchsäurebakterien
(memo: Stoffwechselkrüppel, Gram-positiv, obligate Gärer)
→ coli-forme Bakterien (Enterobacter: Boden / *E.coli*: Darm)

(2) Gasbildung: Enterobacter > *E.coli*

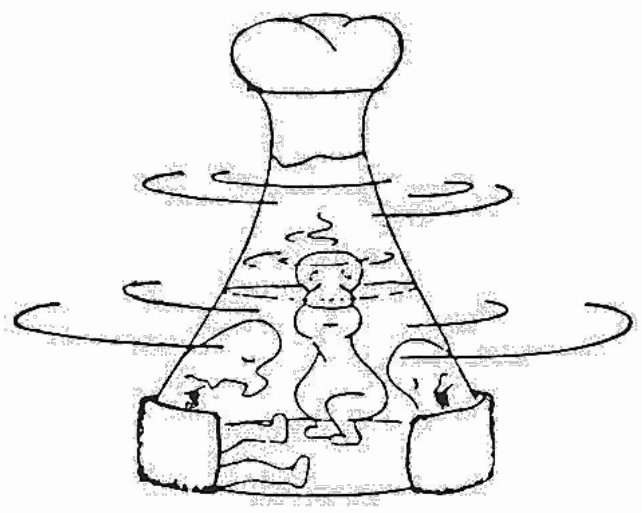


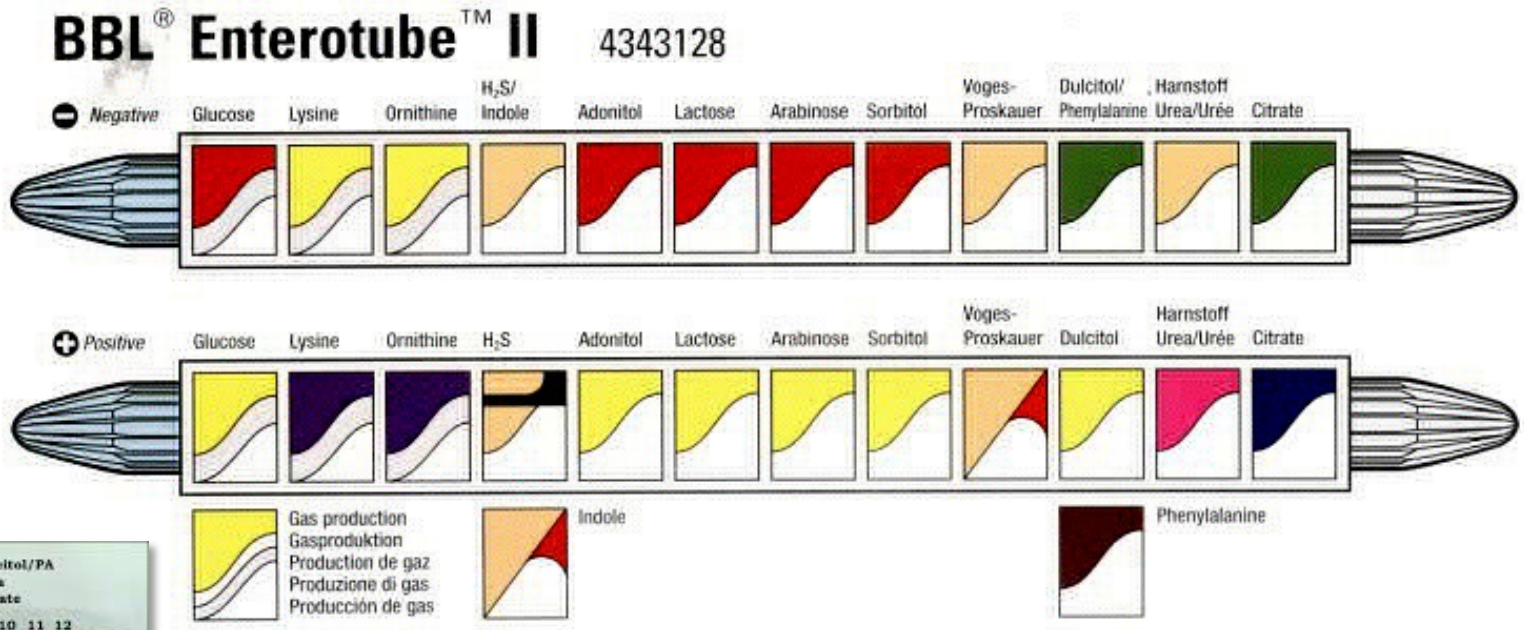
Mit definierten Einzelkolonien!

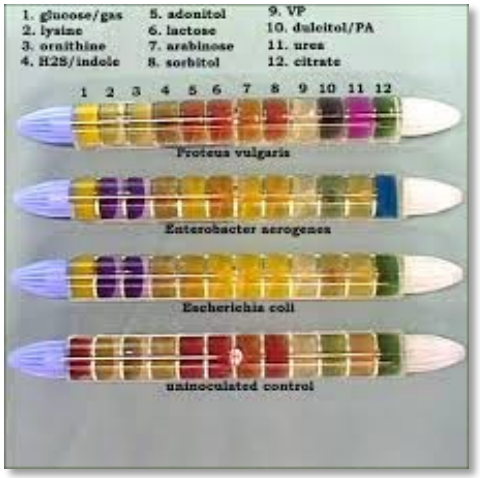


Stoffwechseltest

bunte Reihe







Stoffwechseltest

bunte Reihe

- SIM-Nährboden zum Nachweis von Indol- und Schwefelwasserstoff-Bildung
  Beim Abbau von Tryptophan wird Indol gebildet, durch Zugabe von Kovacs' Indolreagenz, das Paradimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich's Aldehyd-Reagenz) enthält, entsteht ein **rotes**/**violettes** Kondensationsprodukt

- Durch Reduktion von Thiosulfat entsteht Schwefelwasserstoff (H_2S), der mit einem Eisen (III)-Komplex als **schwarzes Eisensulfid (FeS)** ausfällt

- Harnstoff-Nährboden zum Nachweis der Urease-Bildung
  Spalten die Bakterien Harnstoff, führt dies zu einer Alkalisierung des Nährbodens, die angezeigt wird durch den Farbumschlag des Indikators Phenolrot von hellrot in **rot-violett**

Stoffwechseltest bunte Reihe

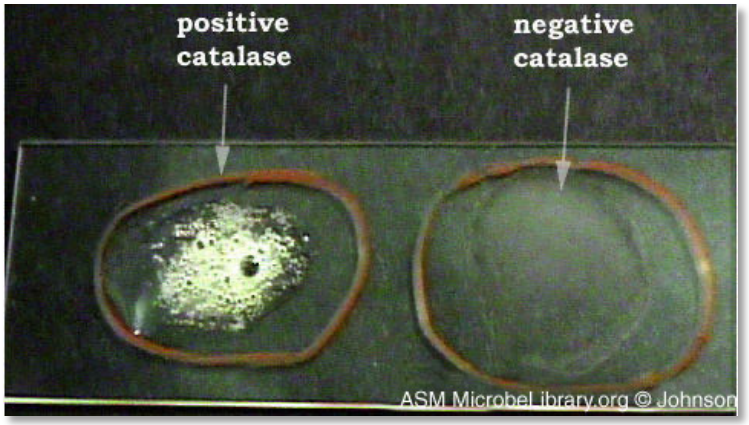
- Die Säurebildung aus Lactose und die Säurebildung aus Saccharose wird durch den Farbumschlag des Indikators Phenolrot von rot nach **gelb** angezeigt

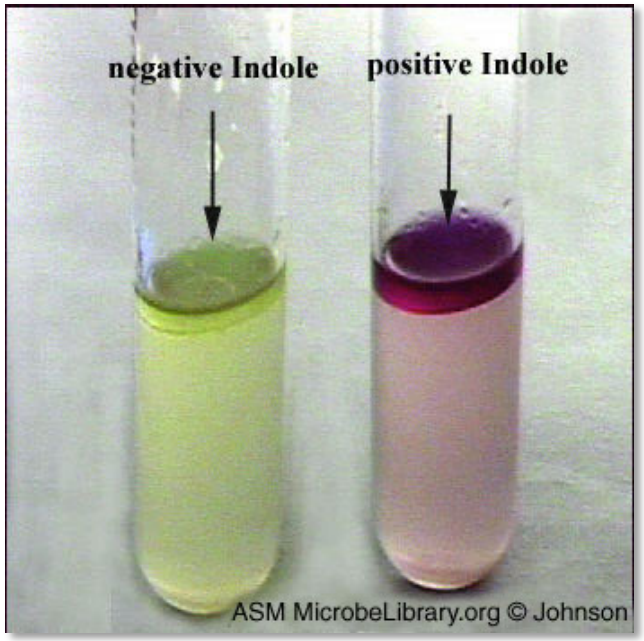
- Wenn Citrat die einzige Kohlenstoffquelle ist, bewirkt der Citratverbrauch einen pH-Anstieg und einen Umschlag des Indikators Bromthymolblau von grün nach **blau**

- Eine geringe Peptonkonzentration und relativ hohe Kohlenhydratkonzentrationen gestatten es, den OF-Nährboden zum Nachweis von Säuren zu verwenden, die entweder durch die oxidative oder fermentative Verwertung von Glukose entstanden sind. Der Abbau von Glukose führt zur Säurebildung und einem nachfolgenden pH-Abfall. Der Bromthymolblau-Indikator schlägt dementsprechend von grün in **gelb** um.

Stoffwechseltest bunte Reihe

Katalasetest





Nachweis der Produktion von Indol aus Tryptophan
-Tryptophanase

Klebsiella & *Enterobacter* (indolnegativ)

Escherichia coli (indolpositiv)

Stoffwechseltest

bunte Reihe

	Ind.	H2S	Urea	Lac.	Sac.	Cit.	OF
Escherichia coli							
Citrobacter freundii							
Klebsiella pneumonia							
Klebsiella oxytoca							
Enterobacter cloacae							
Proteus mirabilis							
Proteus vulgaris							
Morganella morganii							
Salmonella spp.							
Pseudomonas aeruginosa							

O = oxidativer und F= fermentativer Glucoseabbau;
Ind.= Indol; Lac.= Lactose; Sac.= Saccharose, Cit.= Citrat.

Stoffwechseltest bunte Reihe